

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-027109

(43)Date of publication of application : 04.02.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/531

(21)Application number : 04-084595

(71)Applicant : SANYO CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 05.03.1992

(72)Inventor : KUNICHIKA MAKOTO

(54) IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT METHOD AND REAGENT KIT THEREFOR**(57)Abstract:**

PURPOSE: To enable highly sensitive measurement by having an immobilized substance, a first nucleic acid combination and a marker second nucleic acid reacted with a substance to be measured to measure a marker volume in produced immunological complex.

CONSTITUTION: An immobilized substance is a combination of a combining substance and a water insoluble carrier, wherein a silicic acid inorganic carrier or the like having a functional group such as an amino group on a surface is preferable as the water insoluble carrier. First and second nucleic acids are both one-chain nucleic acid selected from deoxyribonucleic acid(DNA) or ribonucleic acid(RNA) whose base sequences are complementary to each other. A substance having the same immunological reaction characteristics as those of a substance to be measured is combined with the first nucleic acid and a marker is combined with the second nucleic acid, respectively. The second nucleic acid may be one-chain DNA or RNA corresponding to only a part of the first nucleic acid, and a plurality of the second nucleic acids can be combined with a molecule of the first nucleic acid using shorter nucleic acid than the first nucleic acid. Therefore, since immunological complex is produced in a form that numerous marker second nucleic acids are combined on the first nucleic acid combination, measurement sensitivity is improved.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

28.05.1993

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2547149

[Date of registration]

08.08.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 2 7 1 0 9

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 2 月 4 日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 33/543		A 9217-2J		
33/531		A 8310-2J		
33/543		E 9217-2J		

審査請求 有 請求項の数 6 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平 4 - 8 4 5 9 5	(71) 出願人	0 0 0 0 0 2 2 8 8 三洋化成工業株式会社 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1
(22) 出願日	平成 4 年 (1992) 3 月 5 日	(72) 発明者	國近 誠 京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三 洋化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫測定法及び免疫測定用試薬キット

(57) 【要約】

【目的】 より高感度で、正確な測定が可能な免疫測定法を提供する。

【構成】 測定しようとする物質に、結合性物質を結合した水不溶性担体、1 重鎖の遺伝子を結合した結合性物質、及び前記遺伝子に対して相補的な塩基配列を持つ 1 重鎖の遺伝子と標識物質の複合体、を反応させて生成する免疫複合体中の標識量を測定する免疫測定法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定しようとする物質（以下「測定物質」という。）に、下記「固定化物質」、下記「第 1 核酸結合体」及び下記「標識第 2 核酸」を反応させて生成する免疫複合体（A）中あるいは未反応の「標識第 2 核酸」中の標識量を測定することを特徴とする免疫測定法。

固定化物質：「測定物質」と特異的な結合性を有する物質（以下「結合性物質」という。）と水不溶性担体との結合体。

第 1 核酸結合体：「結合性物質」、あるいは「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質と、1 重鎖のデオキシリボ核酸またはリボ核酸（以下「第 1 核酸」という。）との結合体。

標識第 2 核酸：「第 1 核酸」と相補的な塩基配列を有する 1 重鎖のデオキシリボ核酸またはリボ核酸（以下「第 2 核酸」という。）に、標識剤を結合させた物質。

【請求項 2】 「第 1 核酸」を構成するリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドから選ばれる単位の種類が、1 種類である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 「結合性物質」が、「測定物質」に対する、抗体または抗原である請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】 「第 1 核酸」及び「第 2 核酸」を各々構成するリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドから選ばれる単位の個数が、10～1,000 である請求項 1～3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5】 「第 2 核酸」を構成するリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドから選ばれる単位の個数が、「第 1 核酸」を構成する同様の単位の個数の 1/100～1/2 である請求項 1～4 のいずれか記載の方法。

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれか記載の、「固定化物質」、「第 1 核酸結合体」および「標識第 2 核酸」を構成品として含む免疫測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、免疫測定法および免疫測定用試薬に関する。更に詳しくは、ヘテロジニアスな免疫測定法および免疫測定用試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、ヘテロジニアスなサンドイッチ免疫測定法においては、①測定しようとする物質（以下「測定物質」という。）に、「測定物質」に対する抗体もしくは抗原を水不溶性担体に結合した物、及び標識された、「測定物質」に対する抗体もしくは抗原を反応させて免疫複合体を生成する方法を用いてきた。更に、②「測定物質」に、「測定物質」に対する抗体（動物種 A が産生したもの）を水不溶性担体に結合した物、「測定物質」に対する抗体（動物種 B が産生したもの）、及び

2

標識された、動物種 B の産生した抗体に対する抗体を反応させて免疫複合体を生成する方法 [例えば、WO 80/02747, EP-119736 など、及び「ジャーナル オブ ヒストケムサイケム」, 8 巻, 1131 頁, 1979 年発行 (GUESDON, J. L., TERNYNCK, T., and AVRAMEAS, S.: J. Histochem. Cytochem., 8: 1131, 1979) など]; ③「標識物質」に、「測定物質」に対する抗体を水不溶性担体に結合した物、ビオチンと「測定物質」に対する抗体の結合体、及び標識されたアビジンを反応させ免疫複合体を生成する方法などが知られている。ヘテロジニアスな競合免疫測定法においても、標識される物質を「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質にすることで、サンドイッチ免疫測定法と同様な測定法が可能である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 近年、免疫測定法においては、更に感度を向上させる要求が高まっているが、上記①の方法では、免疫複合体中の標識量を増すことは難しいため、更に高感度な測定とすることは難しい。また、上記②の方法では、動物種間の交差反応の無い抗体を使用する必要性があり、また、血清検体中に抗体に干渉する物質が存在する場合、測定値が異常を示すことがある。上記③の方法は、免疫複合体中の標識量を増すことができるが、非特異的な吸着も大きく、結果的に高感度な測定とならない。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、塩基配列が相補的な関係のある 2 種類の 1 重鎖核酸を用い、内 1 種類は標識させる方法を利用した免疫測定法により更に感度が上昇することを見だし、本発明に到達した。すなわち本発明は、下記①の測定法および②の測定用試薬キットにより構成される。

①：測定しようとする物質（以下「測定物質」という。）に、下記「固定化物質」、下記「第 1 核酸結合体」及び下記「標識第 2 核酸」を反応させて生成する免疫複合体（A）中あるいは未反応の「標識第 2 核酸」中の標識量を測定することを特徴とする免疫測定法。

固定化物質：「測定物質」と特異的な結合性を有する物質（以下「結合性物質」という。）と水不溶性担体との結合体。

第 1 核酸結合体：「結合性物質」、あるいは「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質と、1 重鎖のデオキシリボ核酸またはリボ核酸（以下「第 1 核酸」という。）との結合体。

標識第 2 核酸：「第 1 核酸」と相補的な塩基配列を有する 1 重鎖のデオキシリボ核酸またはリボ核酸（以下「第 2 核酸」という。）に、標識剤を結合させた物質。

②：上記①記載の、「固定化物質」、「第 1 核酸結合体」および「標識第 2 核酸」を構成品として含む免疫測定用試薬キット。

10

20

30

40

50

3

【 0 0 0 5 】本発明において、「測定物質」としては、免疫測定法が利用できる物であれば特に限定は無い。例えば、ハプテン（ジゴキシン、サイロキシン、トリヨードサイロニン、コルチゾールなど）、ホルモン（甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、インスリン、成長ホルモンなど）、血清タンパク質（免疫グロブリン、C-反応性蛋白など）、腫瘍関連抗原（ α -フェトプロテイン、癌胎児性抗原、胎児性フェリチンなど）、ウイルス及びウイルス関連抗原（風疹ウイルス、ヘルペスウイルス、HBs抗原、HBc抗原など）などがあげられる。

【 0 0 0 6 】「固定化物質」における該水不溶性担体としては、例えば、ケイ酸無機担体（ガラス、シリカゲルなど）、および有機担体（プラスチック、ニトロセルロース、デキストランなど）があげられる。表面にアミノ基、チオール基、カルボキシル基、活性エステル基などの官能基をもつものが、「結合性物質」と結合させ易いため好ましい。また、その形状は、粒子状、シート状、チューブ状などいずれの形もとるが、より好ましい例としては、粒径0.1~50 μ m程度の微粒子状である。

【 0 0 0 7 】本発明において用いられる「第1核酸」と「第2核酸」は、共にデオキシリボ核酸（DNA）もしくはリボ核酸（RNA）から選ばれる、1重鎖の核酸であり、塩基配列が相補的な関係にある。従って、「第1核酸」と「第2核酸」はハイブリダイズすることが可能である。「第1核酸」と「第2核酸」は相補的な配列であればどの様な1重鎖のDNAまたはRNAも用いることが可能であるが、分子内でループ構造の生じない塩基配列が良い。好ましい例として、「第1核酸」を構成するリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの単位の種類が、1種類であるものがあげられる。この単位としては、アデニル酸、ウリジル酸、グアニル酸、シチジル酸、デオキシシチミジル酸、デオキシアデニル酸、デオキシグアニル酸、デオキシシチジル酸があげられ、従って、これらから1種類が選ばれたものが好ましい。また、1種類のヌクレオチド単位から構成される「第1核酸」に対して、「第2核酸」は、「第1核酸」の任意の部分で対応結合できるメリットがある。なお、「第2核酸」の塩基配列は、「第1核酸」の塩基配列に対応して相補的に決まる。

【 0 0 0 8 】「第1核酸」、「第2核酸」を構成するリボヌクレオチド単位あるいはデオキシリボヌクレオチド単位の個数は、10から1,000の範囲が良い。10より少ない場合、ハイブリダイズの結合力が低く、1,000を越える場合、分子量が大きすぎるため反応性が低下し好ましくない。

【 0 0 0 9 】また、「第2核酸」は「第1核酸」の1部分のみに対応する1重鎖のDNAもしくはRNAでも良い、すなわち「第1核酸」より短い核酸を使用することができる。従って1分子の「第1核酸」に複数の「第2

4

核酸」が結合することができる利点がある。特に好ましくは、「第1核酸」が1種類のヌクレオチドから構成された核酸である場合であり、より短い「第2核酸」は、「第1核酸」の任意の部分に結合できるため、効率的に多くの分子が「第1核酸」に結合することができる。即ち、「第1核酸結合体」上に「標識第2核酸」をより多く結合した形で、該免疫複合体（A）が生成されるため、測定感度を向上することになる。好ましい、「第2核酸」の鎖長は、「第1核酸」の1/100~1/2の範囲内にある鎖長である。

【 0 0 1 0 】「第1核酸」及び「第2核酸」は、従来既知の方法で合成あるいは生体より抽出して使用できる。好ましいものは、合成法により作成された核酸で、その末端にアミノ基などの官能基を導入されたものである。導入された官能基は、「結合性物質」あるいは「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質、および標識剤との結合に便利である。

【 0 0 1 1 】「固定化物質」は、従来既知の方法で行うことができる。例えば、ポリスチレン担体にタンパク質を物理吸着する方法、水不溶性担体の表面の官能基に「結合性物質」のもつアミノ基などを共有結合する方法がある。結合の後、担体の表面及び表面の未反応官能基を適当なタンパク質、核酸、界面活性剤などでブロッキングすることも通常行われる。

【 0 0 1 2 】「結合性物質」としては、「測定物質」に対し特異的な結合性を有するものであり、抗体、抗原、レクチン、プロテインAなどがあげられるが、「測定物質」に対応できる範囲で自由に選択することが可能である。さらに「固定化物質」と「第1核酸結合体」に用いられる、「結合性物質」は、必ずしもおなじ物質である必要はない。「結合性物質」の好ましい例としては、「測定物質」に対するモノクローナル抗体があげられる。この場合、「固定化物質」と「第1核酸結合体」に各々用いられモノクローナル抗体は、「測定物質」に対する認識部位が各々異なる抗体であればさらに良い。

【 0 0 1 3 】「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質としては、「測定物質」と同一の物質、「測定物質」の断片で、「測定物質」の免疫反応特性を有するもの、「測定物質」と「結合性物質」との反応に関与しない物質と、「測定物質」との複合体などがあげられる。

【 0 0 1 4 】「第1核酸結合体」である、「結合性物質」、あるいは「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質と「第1核酸」の結合体は、従来知られている蛋白分子の架橋結合法を使用して作成できる。例えば、「結合性物質」にチオール基を導入し、「第1核酸」に導入されたアミノ基との間を2架橋性試薬で結合することにより「第1核酸結合体」ができる。

【 0 0 1 5 】「第1核酸結合体」が、「結合性物質」と「第1核酸」を結合させた物質である場合、本発明の方法は、サンドイッチ免疫測定法の原理にもとづく方法で

10

20

30

40

50

ある。また、「第1核酸結合体」が、「測定物質」と同じ免疫反応特性を有する物質と、「第1核酸」を結合させた物質である場合、本発明の方法は、競合免疫測定にもとづく方法である。

【0016】「標識第2核酸」に用いられる標識する物質（標識剤）としては、例えば、アイソトープ、酵素、蛍光体および発光体があげられる。これらはいずれも公知のものを使用することができる。例えば、アイソトープとしては、 ^{125}I など、酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなど、蛍光体としてはユーロピウム誘導体など、発光体としては、N-メチルアクリジウム誘導体などがあげられる。

【0017】「標識第2核酸」の作成は、上記いずれのタイプも、従来公知のタンパク質と標識剤の結合方法を応用して行うことができる。例えば、酵素により標識する方法としては、ナカネ等、ジェー、ヒストケム、サイトケム、22;1084, 1974に記載の方法などがあげられる。蛍光体により標識する方法としては、アイ、ヘミラ、エス、ダブク、エトール、;アナル、パイオケム、137:335, 1984記載の方法などがあげられる。発光体により標識する方法としては、エイ、ウッドヘッド、アイ、ウィークス;クリン、ケム、29:1480, 1983記載の方法などがあげられる。

【0018】本発明における、反応の順序および条件について以下に述べる。反応の順序としては、種々の順がとりうるが、好ましい例として、①「測定物質」に「第1核酸結合体」及び「固定化物質」を逐次あるいは同時に反応させた後、更に「標識第2核酸」を反応させることにより該免疫複合体(A)を得る;②「測定物質」に「固定化物質」を反応させた後、更に「第1核酸結合体」および「標識第2核酸」を逐次あるいは同時に反応させることにより該免疫複合体(A)を得る;③「測定物質」に、「固定化物質」と「第1核酸結合体」および「標識第2核酸」を同時に反応させることにより該免疫複合体(A)を得る;④「測定物質」に「第1核酸結合体」および「標識第2核酸」を逐次あるいは同時に反応させた後、更に「固定化物質」を反応させる;などがある。各反応における構成成分の投入順序、未反応物の除去などは、適宜行うことができる。

【0019】反応を行う温度、各反応を行う溶液の組成、pHなどは、通常免疫測定及びハイブリダイゼーションアッセイで行われる条件で可能である。例えば、温度としては、5~60℃、pHとしては5~9が好ましく、反応を行う溶液は、適当な緩衝液に塩類、タンパク質、界面活性剤などを必要により添加した物が好ましい。

【0020】反応の結果、生成する免疫複合体(A)中に、「測定物質」の量におうじて標識剤が存在すること

になる。未反応物を除去した後、標識剤の量を測定すること、または未反応物中の標識剤量を測定することで、「測定物質」の量を決定することが可能である。標識剤の量の測定は、標識剤の種類と共に種々の方法を取りうるが、いずれも当業者により自由に選択できるものである。測定された標識量を、既知量の「測定物質」を測定した場合の標識量と比較することにより、検体中の測定物質量を決定できる。

【0021】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに説明するが本発明はこれに限定されるものではない。

【0022】実施例1

この実施例は、本発明による α -フェトプロテイン(AFP)の測定を、長さの異なる合成DNAを用いたものである。

【0023】1) ポリデオキシアデニル酸、及びポリデオキシチミジル酸の合成

自動DNA合成機(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製、モデル392)を用いて、装置添付の使用法にもとずき、ヌクレオチド数10、50、100のポリデオキシアデニル酸を各々合成し、更に5'末端にアミノヘキシルリンカー(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製、Aminolink 2)によりアミノ基を導入した。合成した各々の鎖長のアミノ基導入ポリデオキシアデニル酸は、カラムで精製した後、蒸留水に溶解し次の操作に用いた。同様にヌクレオチド数10、50、100のアミノ基導入ポリデオキシチミジル酸を合成した。

【0024】2) ポリデオキシアデニル酸結合抗体の作成

抗AFP抗体(ダコ社製)から、イー、イシカワ、エム、イマガワ、エトール、ジェー、イムノアッセイ、4;209, 1983記載の方法でFab抗体を作成した。1)で合成した各々の鎖長のアミノ基導入ポリデオキシアデニル酸溶液(核酸量1mg)とFab抗体(10mg)をリン酸緩衝液(0.1モル、pH6.0、1mMのEDTA含有)2ml中で混合融解し、10 μ lのジメチルホルムアミドに溶解した2架橋性試薬N-(γ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS;同仁化学製)0.2mgを添加し、30℃で2時間反応した。リン酸緩衝液で透析し、未反応GMBSを除去し、ポリデオキシアデニル酸結合抗AFP抗体とした。4℃で保存し、使用時、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で希釈して用いた。

【0025】3) 抗AFP抗体結合微粒子の作成

表面に活性エステル基を有するコポリマー粒子(国産化学(株)製、ASUCOPOLYMER;平均粒子径1 μ m)10mgを2mlのリン酸緩衝液(0.02モル、pH7.2)で2回洗浄遠心し、0.5mlのリン酸緩衝液に懸濁した。抗AFP抗体(ダコ社製)1mgを微粒子

懸濁液に加え、室温で8時間反応した。0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で2回洗浄したのち、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液2mlに懸濁し、使用するまで4℃で保存した。

【0026】4) ポリデオキシチミジル酸結合ペルオキシダーゼの作成

西洋ワサビペルオキシダーゼ(東洋紡社製)1mgをリン酸緩衝液(0.1モル、pH6.0、1mM EDTA含有)1ml中で融解し、0.1mgの2-イミノチオラン塩酸塩を添加し37℃、30分反応した。反応液をゲル濾過カラムにかけ未反応の2-イミノチオランを除き、チオール基導入ペルオキシダーゼとした。

【0027】アミノ基導入ポリデオキシチミジル酸溶液に、ジメチルホルムアミドに溶解した2架橋性試薬N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS; 同仁化学製)0.2mgを添加し、30℃で2時間反応した。リン酸緩衝液で透析し、未反応GMBSを除去した。チオール基導入ペルオキシダーゼ溶液を加え、4℃、8時間反応し、ポリチミジル酸結合ペルオキシダーゼとした。4℃で保存し、使用時、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で希釈して用いた。

【0028】5) 測定操作

血清検体50μlと希釈したポリデオキシアデニル酸結合抗AFP抗体50μl及び抗AFP抗体結合微粒子懸

濁液5μlを試験管中で37℃、15分反応した後、蒸留水2mlで微粒子を3回洗浄遠心した。上清をすて、希釈したポリデオキシチミジル酸結合ペルオキシダーゼ溶液100μlを加え、粒子を再懸濁し37℃、15分反応した後、蒸留水2mlで微粒子を3回洗浄遠心した。上清をすて、基質液(過酸化水素含有0-フェニレンジアミン溶液)0.5mlをくわえ粒子を再懸濁し37℃、15分反応した。遠心し上清の吸光度を492nmで測定した。既知濃度のAFPを含む標準溶液を同様に測定し作成した検量線から、検体中のAFP濃度を読み取った。標準溶液は市販AFP測定キット「グラザイムAFP-EIA TEST」(和光純薬より発売)のものを使用した。

【0029】6) 測定結果

ヌクレオチド数の異なる、ポリデオキシアデニル酸結合抗AFP抗体とポリデオキシチミジル酸結合ペルオキシダーゼを各々組み合わせて標準AFPを測定した結果を表1に示した。抗体に結合した核酸の鎖長が短い場合、やや感度が低い、抗体に結合した核酸の鎖長に対して、標識の結合した核酸の短い場合、感度の向上が認められる。

【0030】

【表1】

抗体に結合した 核酸の鎖長 (ヌクレオチド数)	ペルオキシダーゼに結合した核酸の鎖長 (ヌクレオチド数)		
	10	50	100
10	0.001 0.432	0.002 0.360	0.001 0.341
50	0.000 1.124	0.001 0.821	0.001 0.790
100	0.002 1.828	0.001 1.537	0.000 0.914

注) 表内、上の数値は標準AFP濃度0ng/ml、下の数値は標準AFP濃度640ng/mlの測定吸光度である。

【0031】正常人及び肝癌患者の血清検体をヌクレオチド数100と10の組合せで測定した結果を表2に示した。

【0032】

【表2】

標準AFP濃度 (ng/ml)	実施例 1 抗体結合核酸長 100 POD結合核酸長 10	比較例 1
	吸光度	吸光度
0	0.002	0.015
20	0.115	0.037
80	0.413	0.091
320	1.203	0.224
640	1.828	0.318
正常人血清 NO. 1	AFP濃度 (ng/ml)	AFP濃度 (ng/ml)
2	2.2	3.1
3	3.8	2.4
4	3.5	5.8
5	4.6	21.8
6	4.3	3.2
7	0.9	2.4
8	1.4	3.8
9	7.7	4.8
10	2.0	3.5
患者血清 NO. 1	6.1	5.1
2	162	142
3	382	324
4	231	42
5	581	560
6	86	102

【0033】比較例 1

この比較例は、従来行われている方法での測定を示したものである。

【0034】1) アビジン結合ペルオキシダーゼの作成
西洋ワサビペルオキシダーゼ(東洋紡社製) 1mgをリン酸緩衝液(0.1モル、pH6.0、1mM EDTA含有) 1ml中で融解し、0.1mgの2-イミノチオラン塩酸塩を添加し37℃、30分反応した。反応液をゲル濾過カラムにかけ未反応の2-イミノチオランを除き、チオール基導入ペルオキシダーゼとした。卵白アビジン(シグマ社製) 1mgを含むリン酸緩衝液(0.1M、pH6.0) 1mlに、ジメチルホルムアミドに溶解した2架橋性試薬N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS; 同仁化学製) 0.2mgを添加し、30℃で2時間反応した。リン酸緩衝液で透析し、未反応GMBSを除去した。チオール基導入ペルオキシダーゼ溶液を加え、4℃、8時間反応した後、ゲル濾過カラムを通し未反応物を除き、アビジン結合ペルオキシダーゼとした。4℃で保存し、使用時、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で希釈して用いた。

【0035】2) ビオチン化抗AFP抗体の作成
抗AFP抗体(ダコ社製) 1mgを含むリン酸緩衝液 1mlに、NHS-ビオチン(N-Hydroxysuccinimido-biotin; PIERCE社製) 0.5mgを溶解したジメチルホルムアミド 20μlを添加し、37℃、90分反応した。ゲル濾過により

未反応物を除去し、抗体画分をえビオチン化抗体とした。1%BSA含有リン酸緩衝液で希釈し用いた。

【0036】3) 測定操作

血清検体 50μlと希釈したビオチン化抗AFP抗体 50μl及びアビジン結合微粒子懸濁液 5μlを試験管中で37℃、15分反応した後、蒸留水 2mlで微粒子を3回洗浄遠心した。上清をすて、希釈したペルオキシダーゼ標識抗AFP抗体溶液 100μlを加え、粒子を再懸濁し37℃、15分反応した後、蒸留水 2mlで微粒子を3回洗浄遠心した。上清をすて、基質液(過酸化水素含有0-フェニレンジアミン溶液) 0.5mlをくわえ粒子を再懸濁し37℃、15分反応した。遠心し上清の吸光度を492nmで測定した。既知濃度のAFPを含む標準溶液を同様に測定し作成した検量線から、検体中のAFP濃度を読み取った。

【0037】4) 測定結果

実施例1と同じ、標準溶液、正常人及び肝臓患者の血清検体の測定結果を前記表2に示した。実施例1よりバックグラウンド(標準0濃度の吸光度)が高く、測定吸光度も低いため測定感度が劣っている。従って、正常人血清の測定値が不正確である。また、正常人血清であるにもかかわらず異常に高値を示したり、患者血清でも低値を示す検体があり臨床的に問題のある結果となった。

【0038】実施例 2

この実施例は生体より分離した遺伝子を利用した本発明によるフェリチン測定の例である。

【0039】1) ファージDNAの精製

M13 クローニングキット (東洋紡社製) を用い、キット添付の説明書にしたがい、菌体からファージ 2 重鎖 DNA、培養上清からファージ 1 重鎖 DNA を精製した。M13 ファージは約 7 0 0 0 のヌクレオチド (7 K b) より構成されている。

【0040】

2) 1 重鎖 DNA 結合抗フェリチン抗体の作成

1) で精製した 1 重鎖 DNA を機械的に攪拌した後、ショ糖密度勾配遠心法により、1 K b の長さの画分を得た。この 1 重鎖 DNA 1 0 μ g を 1 m l のリン酸緩衝液 (0. 1 モル、pH 6. 0) に溶解した液に、5 μ g の 2-イミノチオラン塩酸塩を添加し 37℃、30 分反応し、チオール基を導入した。3 倍量のエタノールを加え DNA を沈澱して回収し、再度 1 m M の EDTA 含有リン酸緩衝液に溶解し、チオール基導入 1 重鎖 DNA とした。

【0041】抗フェリチン抗体 (ダコ社製) 1 m g を含むリン酸緩衝液 (0. 1 モル、pH 6. 0) 1 m l に、ジメチルホルムアミドで溶解した G M B S 0. 5 m g を添加し 30℃、90 分反応した。リン酸緩衝液に対して透析し、未反応の G M B S を除去した後、チオール基導入 1 重鎖 DNA 溶液と混合し 8 時間反応した後、ゲルろ過カラムにより未反応物を除去し、1 重鎖 DNA 結合抗フェリチン抗体とした。

【0042】3) ³²P 標識 DNA の作成

1) で精製した 2 重鎖 DNA (R F - DNA) に、テー、マニアチス、エトール、モレキュラークローニング: 1 0 9 - 1 1 2, コールドスプリングハーバーラボラトリ (1 9 8 2) に記載のニックトランスレイション法を用いて、³²P を導入した。導入後、R F - DNA を超音波により破壊し、アガロースゲル電気泳動により、鎖長 5 0 0 ~ 3 0 0 b p、2 0 0 ~ 5 0 b p 以下の 2 つの画分を得た。使用時に、7 0℃で加熱して ³²P 標識 1 重鎖 DNA として用いた。

【0043】4) 抗フェリチン抗体結合微粒子の作成
表面に活性エステル基を有するコポリマー粒子 (国産化学 (株) 製、A S U コポリマー; 平均粒子径 1 μ m) 1 0 m g を 2 m l のリン酸緩衝液 (0. 0 2 モル、pH 7. 2) で 2 回洗浄遠心し、0. 5 m l のリン酸緩衝液に懸濁した。抗フェリチン抗体 (ダコ社製) 1 m g を微粒子懸濁液に加え、室温で 8 時間反応した。0. 1 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で 2 回洗浄したのち、0. 1 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 2 m l に懸濁し、使用するまで 4℃で保存した。

【0044】5) 測定操作

標準フェリチン溶液 5 0 μ l と希釈した 1 重鎖 DNA 結合抗フェリチン抗体 5 0 μ l 及び抗フェリチン抗体結合微粒子懸濁液 5 μ l を試験管中で 37℃、15 分反応した後、蒸留水 2 m l で微粒子を 3 回洗浄遠心した。上清をすて、希釈し加熱処理した ³²P 標識 DNA 溶液 1 0 0

μ l を加え、粒子を再懸濁し 37℃、30 分反応した後、蒸留水 2 m l で微粒子を 3 回洗浄遠心した。上清をすて、シンチレーションカウンターで ³²P からのカウントを測定した。標準フェリチンは、市販フェリチン測定キット「グラオザイム フェリチン」(和光純薬より発売) のものを使用した。

【0045】6) 測定結果

本実施例での、フェリチンの検量線を図 1、図 2 に示した。図 1 は、³²P 標識 DNA の鎖長が 5 0 0 ~ 3 0 0 b p の場合の結果である。図 2 は、³²P 標識 DNA の鎖長が 2 0 0 ~ 5 0 b p の場合の結果である。鎖長の短い方が、測定感度がより高くなっている。

【0046】実施例 3

本実施例は、本発明によるサイロキシン (T 4) の競合免疫測定の例である。

【0047】

1) ポリデオキシアデニル酸結合サイロキシンの作成
T 4 (カルバイオケミストリー社製) 1 m g にジメチルホルムアミド 1 m l を加え、溶解した。この溶液 1 m l に 0. 2 m g の 2-イミノチオラン塩酸塩を加え、室温で 1 時間反応した後、ゲルろ過により未反応の 2-イミノチオラン塩酸塩を除去し、チオール基導入 T 4 とした。実施例 1 で作成したアミノ基導入ポリデオキシアデニル酸 (ヌクレオチド数 1 0 0) をリン酸緩衝液に溶解し、ジメチルホルムアミドで溶解した G M B S 0. 1 m g を添加し、37℃、90 分反応した後、ゲルろ過により未反応 G M B S を除き、核酸画分を得た。核酸画分にチオール基導入 T 4 を添加し、37℃、90 分反応したのち、ゲルろ過により未反応物を除去し、ポリデオキシアデニル酸結合サイロキシンとした。

【0048】2) 抗 T 4 抗体結合微粒子の作成

表面に活性エステル基を有するコポリマー粒子 (国産化学 (株) 製、A S U コポリマー; 平均粒子径 1 μ m) 1 0 m g を 2 m l のリン酸緩衝液 (0. 0 2 モル、pH 7. 2) で 2 回洗浄遠心し、0. 5 m l のリン酸緩衝液に懸濁した。抗 T 4 抗体 (ダコ社製) 1 m g を微粒子懸濁液に加え、室温で 8 時間反応した。0. 1 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で 2 回洗浄したのち、0. 1 % 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 2 m l に懸濁し、使用するまで 4℃で保存した。

【0049】3) 測定方法

標準 T 4 溶液 (T 4 を T 4 フリー血清に溶解したもの) 5 0 μ l と抗 T 4 抗体結合微粒子懸濁液 5 μ l および希釈したポリアデニル酸結合サイロキシン溶液 5 0 μ l を 37℃、15 分反応した。反応後、蒸留水 2 m l で微粒子を 2 回洗浄遠心した。上清をすて、実施例 1 で作成したポリデオキシチミジル酸 (ヌクレオチド数 5 0) 結合ペルオキシダーゼの希釈溶液 2 0 0 μ l を加え、37℃、15 分反応した。反応後、蒸留水 2 m l で微粒子を 2 回洗浄遠心した。上清をすて、基質液 (過酸化水素含

13

有0-フェニレンジアミン溶液) 0.5 ml を加え粒子を再懸濁し 37℃、15分反応した。遠心し上清の吸光度を 492 nm で測定した。

【0050】4) 測定結果

本実施例での、T4 測定の検量線を図 3 に示した。短時間の測定条件で、充分な測定感度を示した。

【0051】

【発明の効果】本発明は、相補的な塩基配列を有する 2 本の 1 重鎖核酸が、ハイブリダイズすることを利用した免疫測定法である。従来、免疫測定法では、高感度な測定を行うために、種々の方法が行われてきたが、充分な効果は獲られなかった。すなわち、免疫複合体中の標識量を十分に増やし、かつ、バックグラウンドを下げることを同時に達成した方法は無かった。本発明は、核酸のハイブリダイズ形成を利用することにより、免疫複合体中の標識量を増すことが可能である。特に、1 重鎖核酸とより短い 1 重鎖核酸を反応することで、結合する標識

14

量を著しく増し、測定感度を向上することが可能となった。また、測定のバックグラウンドも低いため、低値の正確性も向上している。さらに、検体中に存在する干渉物質の影響を受け難く、臨床的に誤った測定値を示すことが無い。以上のように、本発明は、高感度で正確な免疫測定を可能とする方法および測定用試薬を提供するものである。

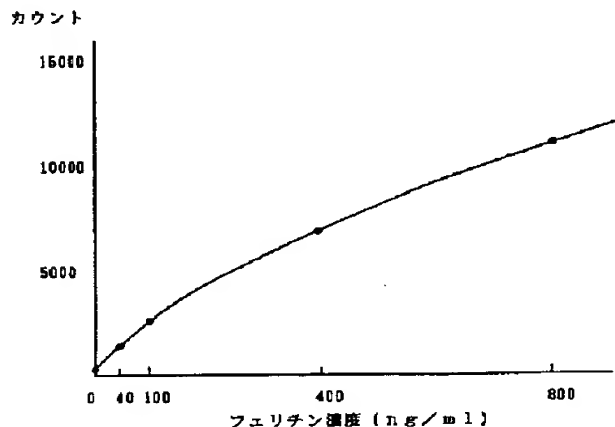
【図面の簡単な説明】

【図 1】実施例 2 において、鎖長 500~300 bp の 32 P 標識 DNA を用いて、標準フェリチンを測定したときの検量線である。

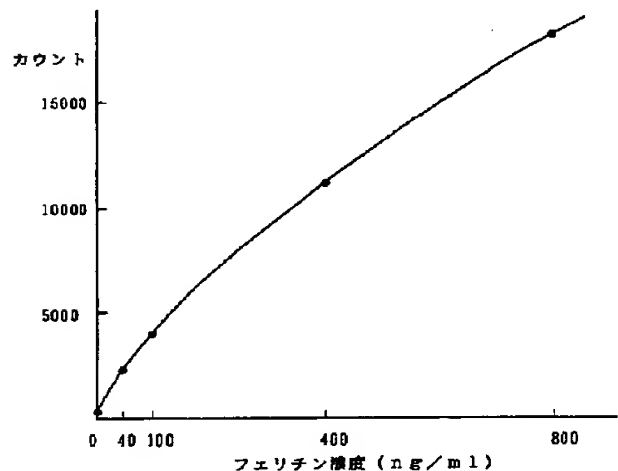
【図 2】実施例 2 において、鎖長 200~50 bp の 32 P 標識 DNA を用いて、標準フェリチンを測定したときの検量線である。

【図 3】実施例 3 において、標準 T4 溶液を測定したときの検量線である。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

